

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Tomoko MAEDA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP99/01803

INTERNATIONAL FILING DATE: 06 April 1999

FOR: METHODS FOR ISOLATION OF OSTEOCLAST PRECURSOR CELLS AND  
INDUCING THEIR DIFFERENTIATION INTO OSTEOCLASTS**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**  
**AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231**BEST AVAILABLE COPY**

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<b><u>COUNTRY</u></b>	<b><u>APPLICATION NO</u></b>	<b><u>DAY/MONTH/YEAR</u></b>
JAPAN	10/95962	08 April 1998
JAPAN	10/170407	18 June 1998

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/JP99/01803**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

**22850**

*Norman F. Oblon*  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

PLEASE  
DO NOT WRITE ON THIS PAGE

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT/JP 99/01803

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

06.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 4月 8日

REC'D 31 MAY 1999

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第095962号

WIPO PCT

出 願 人  
Applicant(s):

塩野義製薬株式会社

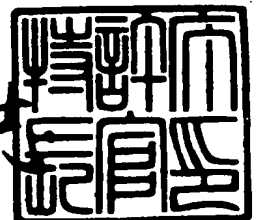
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3028491

【書類名】 特許願

【整理番号】 A005854

【提出日】 平成10年 4月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明の名称】 破骨細胞前駆細胞の単離並びにその破骨細胞への分化誘導法

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区住吉本町 1-1-39-402

【氏名】 前田 朋子

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒郡平群町緑ヶ丘 3-1-21

【氏名】 鈴木 隆二

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区須磨寺町 1-3-7

【氏名】 越智 隆弘

【特許出願人】

【識別番号】 000001926

【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代表者】 塩野 芳彦

【代理人】

【識別番号】 100108970

【弁理士】

【氏名又は名称】 山内 秀晃

【電話番号】 06-202-2161

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044602

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9720909

【プルーフの要否】 要

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 明細書

【発明の名称】 破骨細胞前駆細胞の単離並びにその破骨細胞への分化誘導法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法。

【請求項 2】 培養条件として末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を使用する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で 1～3 週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法。

【請求項 5】 末梢血または関節液をサイトカイン非存在の哺乳類細胞基本培地に添加し、35～37℃、5～7%CO<sub>2</sub>下で 1～3 週間培養することにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 請求項 4 または 5 のいずれかに記載の方法により単離されることを特徴とする破骨細胞前駆細胞。

【請求項 7】 請求項 4 または 5 のいずれかに記載の方法により得られた破骨細胞前駆細胞を、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞に分化させる方法。

【請求項 8】 培養条件として末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を使用する請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 請求項 1～3、7～9 のいずれかに記載の方法により得られたことを特徴とする破骨細胞。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法。

【請求項 12】 請求項 11 記載のスクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

BEST AVAILABLE COPY

【発明の属する技術分野】

本発明は、支持細胞非存在下で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、該破骨細胞を用いたスクリーニング方法およびそのスクリーニング方法により得られた骨代謝疾患治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

哺乳類の骨組織は、骨吸収と骨形成を繰り返している。そして、成長期はもちろん、個体が成熟した後もカルシウム代謝の中心として機能しながら骨吸収と骨形成のバランスが保たれている。

【0003】

これは破骨細胞と骨芽細胞との間で密接な情報伝達が行われて、骨吸収と骨形成のバランスが保たれているためである。

しかし、骨吸収と骨形成のバランスが崩れると骨代謝疾患が生じる。骨代謝疾患としては、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、変形性関節症、糖尿病にともなう骨量の減少、種々のホルモン異常、栄養障害、大理石病、骨軟化症などが挙げられるが、病態の細胞学的解明はあまり進んでいないのが現状である。

【0004】

従って、これら骨代謝疾患を解明し、治療薬を開発するためには、破骨細胞や骨芽細胞の単離と性状解析が必要とされてきた。

【0005】

従来、破骨細胞の単離に関する研究は、主にマウスやラットにおいて進められてきたが、近年はヒト破骨細胞の単離について研究が進められており、FujikawaらはFujikawa,Y.,Sabokbar,A.,Neale,S.,and Athanasou,N.A., "Human osteoclast formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis" Annals of Rheumatic Diseases.55:816-822,1996.において、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織からマウス骨芽細胞様細胞株の存在下

で破骨細胞を得ることについて報告している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化は、骨髄ストローマ細胞や骨芽細胞などとの協調により起こるため、従来、*in vitro*における破骨細胞前駆細胞の分化誘導には骨髄ストローマ細胞や骨芽細胞などの支持細胞の存在が不可欠であると考えられていた。

【0007】

しかし、分化機構を解析のためには、破骨細胞の前駆細胞から破骨細胞への分化に関与する因子が少ない、特に支持細胞を必要としない破骨細胞の分化誘導方法の確立が望まれていた。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、破骨細胞の分化誘導に関与する因子を少なくする方法を提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、該方法により単離された破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法及び該破骨細胞、該破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法及び該スクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤に関する発明を見出し、これを完成させた。

【0009】

本発明によれば、同一個体から繰り返し破骨細胞が入手でき、病態生理学的な検討や免疫学的な検討を加えることができる。また、本発明の破骨細胞を用いることにより、化合物が骨代謝疾患の治療に有用であるか否かのスクリーニングを容易に行うことが可能である。例えば、破骨細胞の骨吸収活性を阻害する化合物をスクリーニングより得た場合、この化合物は、過剰な骨吸収により生じる骨粗鬆症、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症などの治療に有用である。

【0010】

本発明の1つの発明は、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨



細胞に分化させる方法に関する。この場合、「支持細胞」とは、破骨細胞前駆細胞に対し、接着および液性因子の産出を通じて、その分化誘導を行なうことができる間葉系細胞を意味する。「支持細胞」としては、骨髓ストローマ細胞、骨芽（細胞様）細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞などが例示される。具体的には該方法において単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を用いる方法に関するものである。更に具体的には該方法においては、末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清は、ヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である。

## 【0011】

また、本発明は、末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法に関する。具体的には末梢血または関節液を、サイトカイン非存在下で哺乳類細胞基本培地に添加し、35～37℃、5～7%CO<sub>2</sub>下で1～3週間培養することにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、または該方法により得られることを特徴とする破骨細胞前駆細胞に関するものである。

「末梢血」とは、哺乳動物の末梢血であり、具体的にはヒト末梢血である。ヒト末梢血を使用する場合には、健常人の末梢血を用いることが出来る。

「関節液」とは、具体的には慢性関節リウマチ（RA）患者の関節より得られた関節液を意味する。

「哺乳類細胞基本培地」とは、細胞が生存するために利用可能な無機塩類と必須アミノ酸またはその誘導体、ビタミン類またはその誘導体を含んだ等張の緩衝液を意味する。「哺乳類細胞基本培地」としては、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)、RPMI 1640またはAIM-Vなどが例示できる。

「破骨細胞前駆細胞」とは、夾雑細胞を実質的に含まない破骨細胞前駆細胞を意味する。

## 【0012】

更に本発明は、前述の末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法により得られた破骨細胞前駆細胞を、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞に分化させる方法に関する。具体的には該方法において末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含有す

る培地にて該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法及び該方法により得られることを特徴とする破骨細胞に関するものである。該方法においては、末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清は、具体的にはヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である。

「破骨細胞」とは、夾雑細胞を実質的に含まない破骨細胞を意味する。

【0013】

別の態様として、本発明は、本発明の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法及び該スクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤に関するものである。

「骨代謝疾患」としては、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症などが例示される。

【0014】

【実施例】

本発明で目的とするヒト破骨細胞は以下に示す方法によって得ることが出来る。

実施例 1 慢性関節リウマチ患者関節液由来のヒト破骨細胞の単離

(1) 細胞成分の分離

慢性関節リウマチ患者の関節より関節液を得る。関節液は、4℃で試験管中に保存する。なお、以下の操作は原則として無菌条件下で行う。1ml～数十ml採取する。この関節液に等量のRPMI 1640培地 (GIBCO BRL, #22400又はその等価物) を添加した後、1000rpm、4℃、5分間遠心分離し、顆粒球やリンパ球などを含む細胞成分を得る。

【0015】

(2) 破骨細胞前駆細胞の単離

得られた細胞成分を、10% (v/v) ウシ胎仔血清 (Fetal Calf Serum:FCS) を添加したDMEM (GIBCO BRL, #12430-21又はその等価物) にて、37℃、5～7%CO<sub>2</sub>下で数週間培養した。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死滅し、破骨細胞前駆細胞 (図1、図2) のみが残った。

【0016】

BEST AVAILABLE COPY

## (3) 培地の調製

破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる培地を調製する。AIM-V培地 (GIBCO BRL, #87-0112) 400mlに、RPMI 1640培地 (GIBCO BRL, #22400) 60ml、ヒト T-STIM40ml (10BRMP/ml; BRMP, Biological Response Modifier Program Jurkat IL-2 reference reagent)、FCS (予め56℃で30分間熱処理し非働化したもの) 50mlおよび抗生物質 (ペニシリン100U及び100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン; GIBCO BRL, #15140-015又はその等価物) を補充して、培地とした。ヒトT-STIMとは、フィトヘマグルチニンで刺激した、ヒト末梢血単核球の培養上清である (Human T-STIM with PHA, Becton Dickinson, #40045)。

【0017】

## (4) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

この破骨細胞前駆細胞を実施例1(3)に記載の培地で刺激すると、37℃・48-96時間で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が起こり、破骨細胞が得られた (図1、図2)。

【0018】

## 実施例2 健康人末梢血液由来のヒト破骨細胞の単離

## (1) 細胞画分の分離

健康人の末梢血50ml~200mlをヘパリンあるいはそれに代わる抗凝固剤の存在下で採取する。Ficoll-paque (Pharmacia Biotech) 比重遠心法により末梢血単核球分画 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得る。PBMCは10%FCS含有RPMI 1640培地に $10^7$ 個/mlで浮遊後、60mm culture dishに1~1.5ml/dish、37℃、5-7%CO<sub>2</sub>下で1-2時間培養する。培養後、37℃の10%FCS含有RPMI 1640培地でdishをリンスし、浮遊系細胞を取り除く。dishに付着した細胞は4℃の血清不含RPMI 1640培地で強く洗い流し、末梢血単球分画 (全PBMCの約3-8%) として回収する。

【0019】

## (2) 破骨細胞前駆細胞の単離

得られた単球分画 ( $0.5-1 \times 10^6$ /ml) を、実施例1(2)と同様に、10% (

v/v) FCSを添加したDMEM (GIBCO BRL, #12430-21又はその等価物) にて、37℃、5～7% CO<sub>2</sub>下で数週間培養した。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死滅し、破骨細胞前駆細胞のみが残った。

【0020】

(3) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

この破骨細胞前駆細胞を実施例1(3)に記載の培地で刺激すると、37℃・48～96時間で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が起こり、破骨細胞が得られた。

【0021】

得られた細胞が、破骨細胞であることの確認は以下の参考例に従った。

【0022】

試験例

(1) 形態学的観察

May-Giemsa染色(MERCK)により細胞を染色し、顕微鏡を用いて観察した。染色後の破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の顕微鏡写真を図1に示す。この結果、分化前の破骨細胞前駆細胞は単球様の形態を有するのに対して、得られた破骨細胞は全て多核(3～100以上)の巨細胞であることが認められた。

【0023】

(2) TRAP染色

分化前の破骨細胞前駆細胞および分化後の破骨細胞を、酒石酸耐性酸フォスファターゼ(Tartrate-resistant acid phosphatase:TRAP)染色キット(SIGMA Co.)により染色し、顕微鏡を用いて観察した。染色後の分化前の細胞(破骨細胞前駆細胞)および分化後の細胞(破骨細胞)の顕微鏡写真を図2に示す。この結果、分化前の細胞(破骨細胞前駆細胞)でもTRAP陽性であるが、分化後の細胞(破骨細胞)は核周囲に殊に強いTRAP陽性像があることが認められた。

【0024】

(3) 骨吸収能

象牙スライスに分化前の破骨細胞前駆細胞を分化のおこる条件（実施例 1（4））で培養後、ヘマトキシリン（SIGMA Co.）で象牙スライスを染色し位相差顕微鏡を用いて観察した。それぞれの表面の顕微鏡写真を図 3 に示す。分化前の破骨細胞前駆細胞は象牙スライスに変化を及ぼさないものの、分化後の破骨細胞はリン酸カルシウムを吸収し、吸収された部分の象牙スライスは濃く染色された。また、分化後の破骨細胞により吸収された象牙スライスを走査電子顕微鏡を用いて観察した。走査電子顕微鏡写真を図 4 に示す。中央部に吸収窩の形成が認められる。これは象牙質中のリン酸カルシウムが吸収されたことにより、コラーゲン繊維が露出したことにより形成されたものである。

さらに、リン酸カルシウム焼結石英ディスク（Osteologic<sup>TM</sup>、住商ファーマ）の上で、破骨細胞前駆細胞を実施例 1（4）に従って分化させ、リン酸カルシウム焼結石英ディスクを位相差顕微鏡を用いて観察した。それぞれの表面の顕微鏡写真を図 5 に示す。分化前の破骨細胞前駆細胞はリン酸カルシウム焼結石英ディスクに変化を及ぼさないものの、分化後の破骨細胞はリン酸カルシウムの吸収（結晶に空隙のできている部分）が認められた。

#### 【0025】

以上、試験例に示された結果より、分化前の細胞が破骨細胞前駆細胞であることおよび分化後の細胞が破骨細胞であることが確認された。

#### 【0026】

##### 【発明の効果】

以上から明らかなように、本発明は、従来では困難であった破骨細胞前駆細胞の単離方法およびその破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる方法を提供するものである。得られた破骨細胞は、骨代謝異常の病態解明の手段、骨代謝異常を抑制する医薬品のスクリーニング方法および骨代謝異常疾患治療剤を提供するものである。

##### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 May-Giemsa 染色後の破骨細胞前駆細胞および破骨細胞を示す顕微鏡写真である。

【図2】 破骨細胞前駆細胞内および破骨細胞内のTRAPが染色されたことを示す顕微鏡写真である。

【図3】 象牙スライスを用いた破骨細胞前駆細胞および破骨細胞のリン酸カルシウム吸収能を示す顕微鏡写真である。

【図4】 破骨細胞が象牙スライスのリン酸カルシウムを吸収することで、形成された吸収窩を示す顕微鏡写真である。

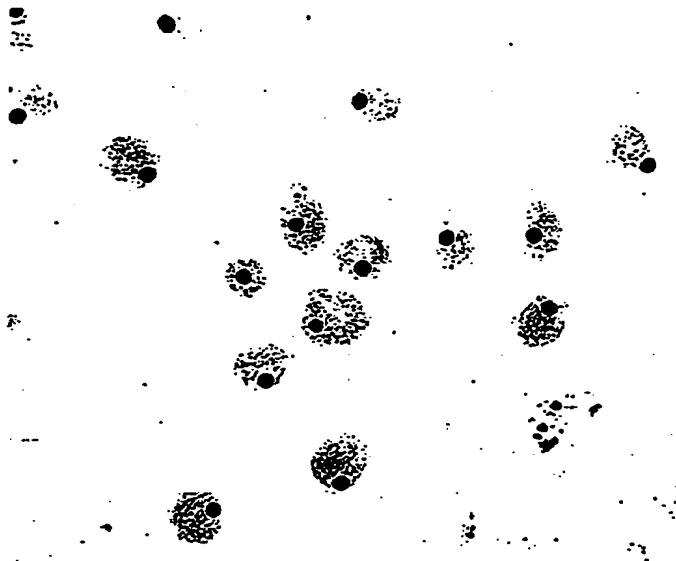
【図5】 リン酸カルシウム焼結石英ディスクを用いた破骨細胞前駆細胞および破骨細胞のリン酸カルシウム吸収能を示す顕微鏡写真である。

【書類名】 図面

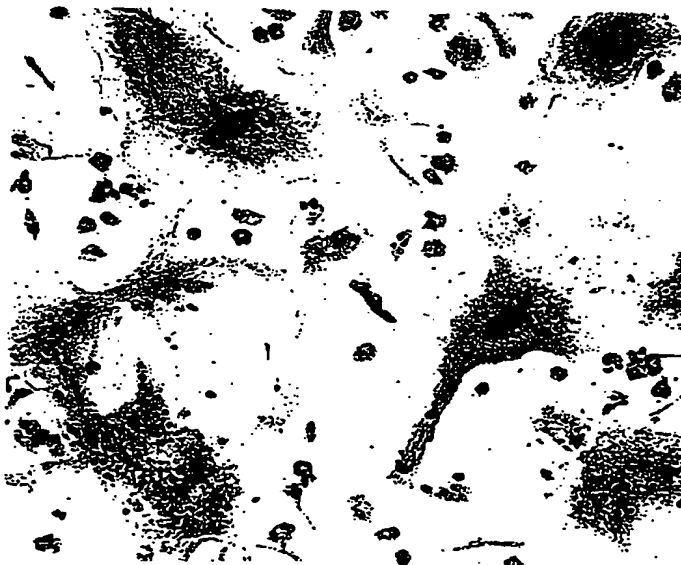
BEST AVAILABLE COPY

【図1】

May-Giemsa 染色

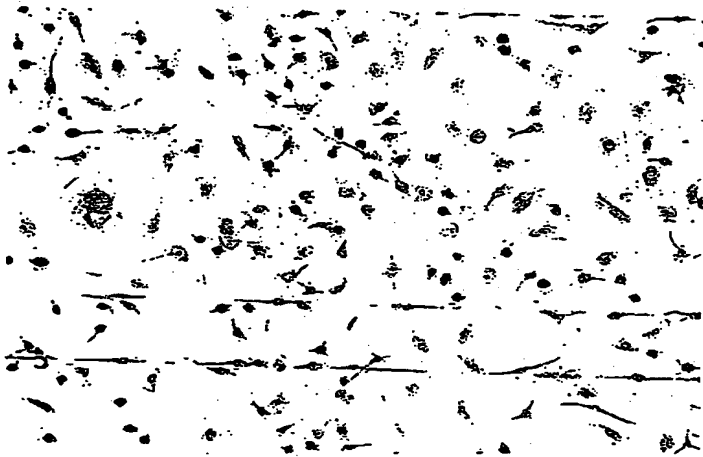


破骨細胞前駆細胞 (×40)

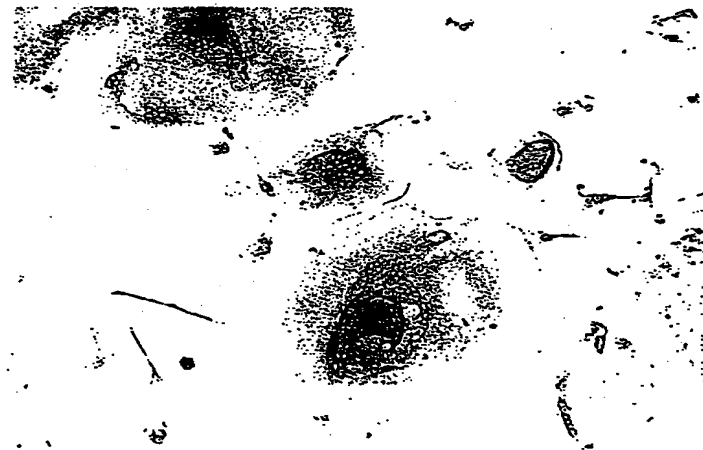


破骨細胞 (×20)

【図2】



破骨細胞前駆細胞

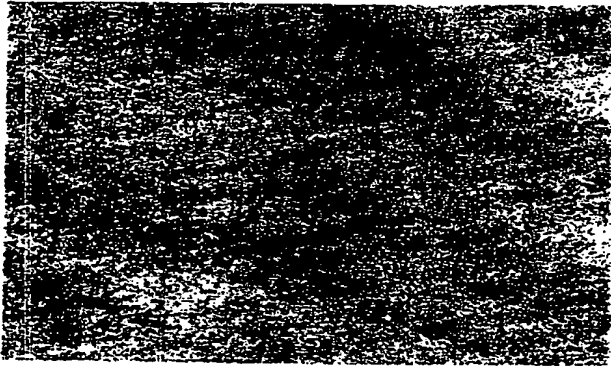


破骨細胞

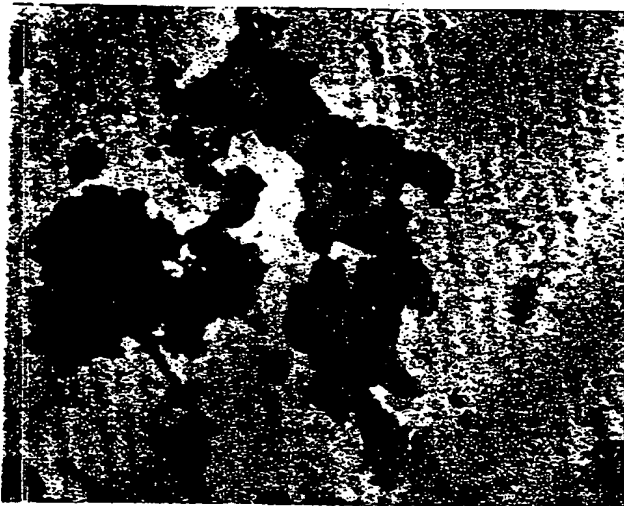


【図3】

BEST AVAILABLE COPY



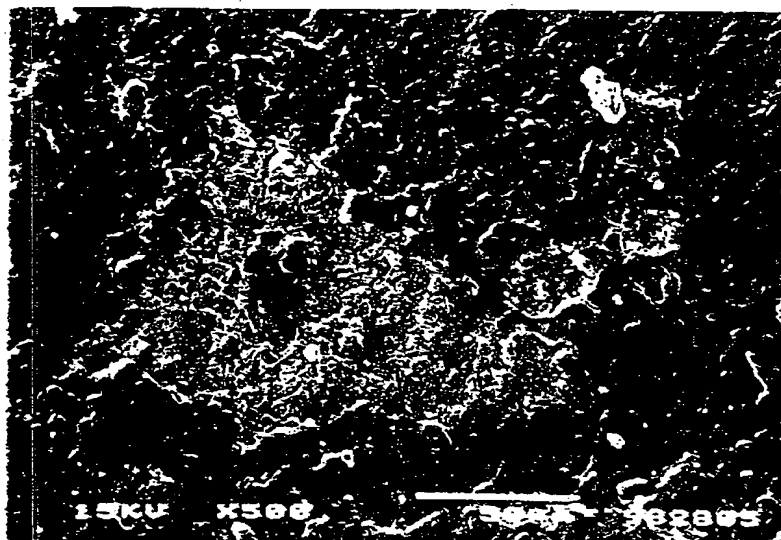
破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

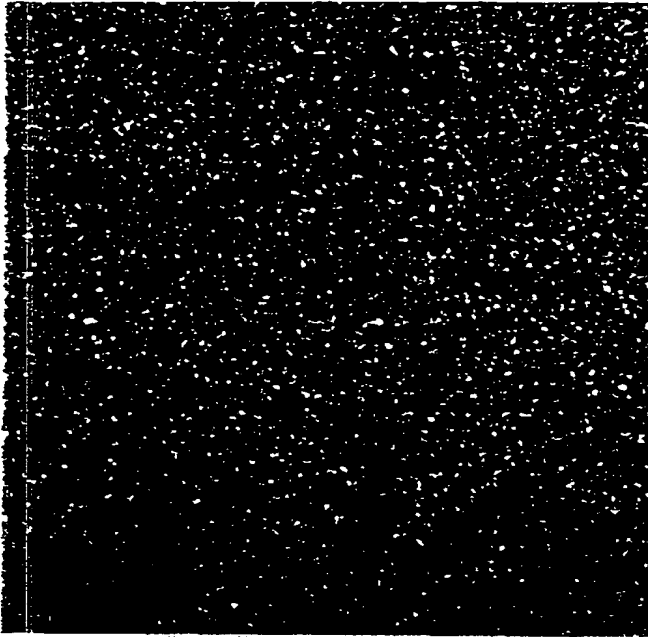
特平10-095962

【図4】

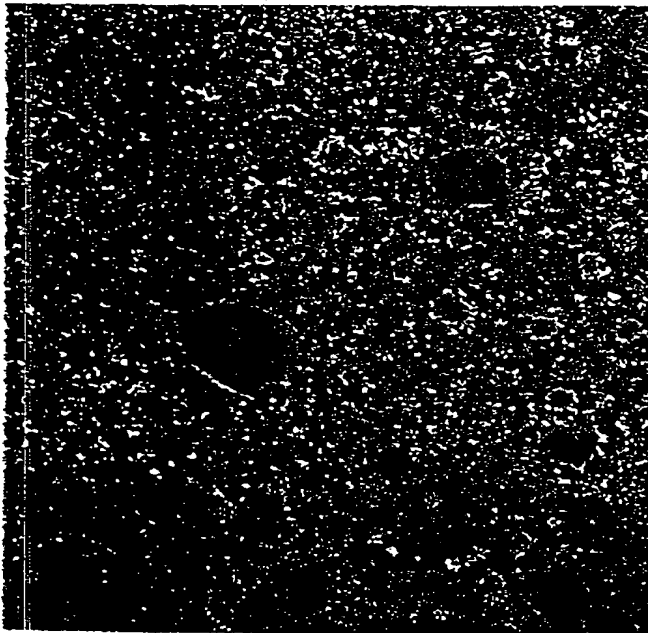


【図5】

BEST AVAILABLE COPY



破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 破骨細胞の分化誘導に関する因子を少なくし、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法を提供する。

【解決手段】 支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法により、分化誘導に関する因子が少ない破骨細胞を得る。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

BEST AVAILABLE COPY

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001926

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

【氏名又は名称】

塩野義製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】

100108970

【住所又は居所】

大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩野義  
製薬株式会社 特許部

【氏名又は名称】

山内 秀晃

特平10-095962

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001926]

1. 変更年月日 1990年 8月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

氏 名 塩野義製薬株式会社